

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Endothelzellanalyse unbehandelter

#### Hornhautlamellen

Die zunächst durchgeführte Analyse des Endothels unbehandelter Hornhautlamellen diente der Erhebung von Referenzwerten, zur Überprüfung der gleichbleibenden Qualität der Präparation und der Kontrolle der verwendeten Software für die Endothelzellanalyse. In diesem Versuch wurden sechs Hornhäute präpariert, sofort im Anschluß daran gefärbt und mikro- sowie makroskopisch fotografiert. Alle Hornhäute dieser Gruppe besaßen nach der Färbung ein vollständig intaktes Endothel ohne Zeichen freiliegender Descemet-Membran. Die Zellen zeigten ihre charakteristische hexagonale Form. Die mittlere Zelldichte betrug 4063 Zellen/mm<sup>2</sup>. Bei einem Durchmesser der Lamellen von 7,5 mm ergibt sich für die Ausdehnung des Endothels eine Fläche von 44,17 mm<sup>2</sup>. Aus diesen Angaben läßt sich eine Zahl von etwa 179500 Endothelzellen pro Lamelle errechnen. Von jeder Lamelle wurden für die Endothelzellanalyse fünf mikroskopische Bilder ausgewertet. Der analysierte Bereich pro Lamelle betrug im Durchschnitt 0,205 mm<sup>2</sup>. Dies entspricht etwa 0,5% der Endothelzellfläche einer Lamelle. Weitere Ergebnisse sind den Tabellen 3.1 und 3.2 zu entnehmen.

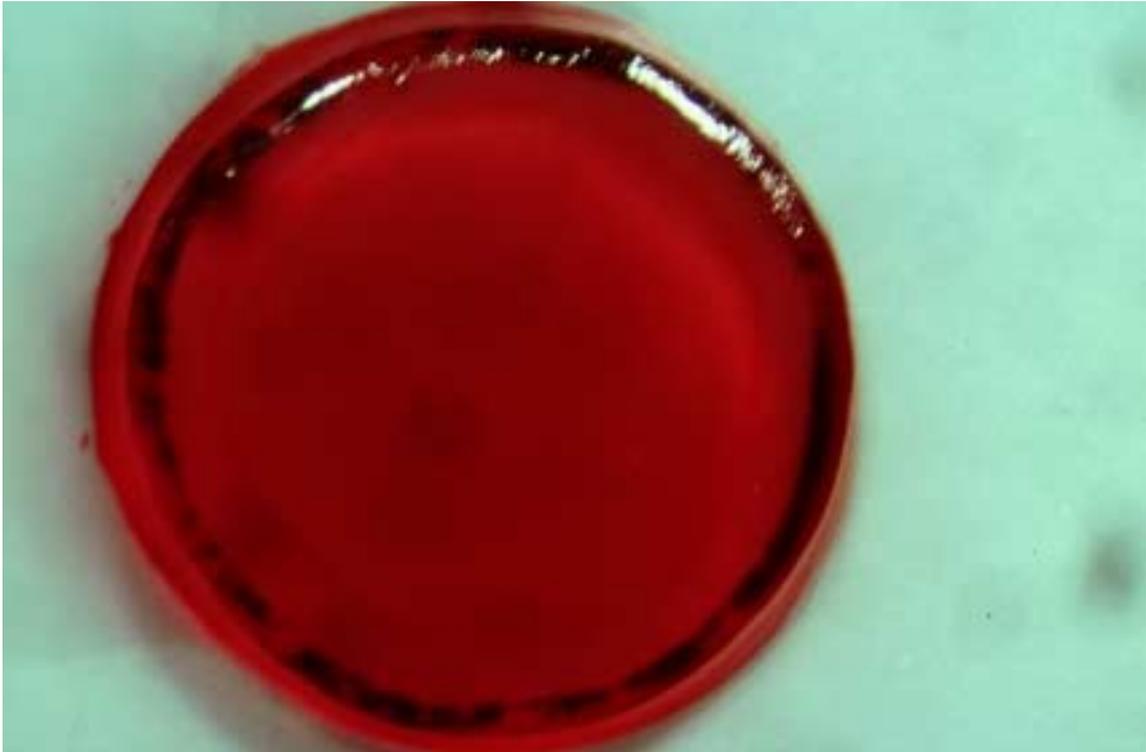
**Tabelle 3.1** Endothelbefund unbehandelter Hornhautlamellen; Anteil des zerstörten Endothels an der gesamten Endothelzellfläche ermittelt aufgrund makroskopischer Aufnahmen der Hornhautlamellen

Lamelle	1	2	3	4	5	6
Zerstörtes Endothel	0	0	0	0	0	0
[% Gesamtfläche]						

**Tabelle 3.2** Ergebnisse der Endothelzellanalyse unbehandelter Hornhautlamellen basierend auf mikroskopischen Aufnahmen des Endothels

Hornhautlamelle Nr.:	1	2	3	4	5	6	$\Sigma$ (gesamt)
Zahl der analysierten Zellen	744	889	897	758	813	890	4991
Analysierte Fläche [mm <sup>2</sup> ]	0,200	0,206	0,207	0,200	0,207	0,208	1,228
							<b>Mittelwert</b>
Zelldichte [Zellen/mm <sup>2</sup> ]	3712	4326	4338	3797	3929	4278	4063
Standardabweichung der Zelldichte	36,8	29,1	30,0	65,4	90,2	82,4	55,7
Mittelwert der Zellgröße [ $\mu\text{m}^2$ ]	269	232	230	263	254	233	247
Standardabweichung der mittleren Zellgröße	2,6	1,3	1,5	4,3	5,8	4,6	3,4
Prozentuale Verteilung der Zellgröße [%]	>500 $\mu\text{m}^2$	0	0	0	0	0	0
	500-400 $\mu\text{m}^2$	0,4	0	0	0,2	0,2	0
	400-300 $\mu\text{m}^2$	13,9	5,6	3,5	12,9	11,9	3,7
	300-200 $\mu\text{m}^2$	68,9	47,5	51,1	62,0	58,2	51,6
	<200 $\mu\text{m}^2$	16,8	46,9	45,4	24,9	29,7	44,7

In Abbildung 12 ist beispielhaft der makroskopische Endothelbefund einer unbehandelten Hornhautlamelle dargestellt.



**Abbildung 12** Makroskopischer Endothelbefund einer unbehandelten Hornhautlamelle; die einheitliche Anfärbung mit Alizarinrot kann als Vitalitätsnachweis für die gesamte Endothelfläche gewertet werden; nur im Randbereich ist es aufgrund der Trepanation zur Endothelschädigung gekommen

### 3.2 Verträglichkeit der Oberfläche des Gefriergutträgers mit dem Hornhautendothel

Ziel dieses Teilversuches war es, festzustellen, ob eine Berührung zwischen dem Hornhautendothel und der Teflon-Oberfläche des Kapton<sup>®</sup>/Teflon<sup>®</sup> „Peel Pouches“ zu einer mechanischen Schädigung des Hornhautendothels führt. Da sowohl beim Einlegen und Herausnehmen, als auch bei der Lagerung der Hornhautlamellen eine Berührung zwischen diesen beiden Strukturen unvermeidbar ist, ist eine gute Verträglichkeit zwischen beiden Voraussetzung für eine hohe Zahl überlebender Endothelzellen.

Zu diesem Zweck wurden fünf Hornhäute präpariert. Es wurden keine Lamellen verwendet, sondern die Hornhäute wurden in ganzer Dicke eingesetzt. Direkt im Anschluß an die Präparation wurden die Hornhäute mit dem Endothel nach unten

weisend auf die teflonbeschichtete Seite des „Peel Pouches“ gelegt. Zuvor war diese mit einem Tropfen Balanced Salt Solution (BSS Alcon Pharma GmbH) befeuchtet worden, um die Gleitfähigkeit der Lamelle zu verbessern. Durch seitlichen Zug am Rand der Hornhäute wurden sie über eine Strecke von fünf Zentimetern hin- und wieder zurückgezogen. Unmittelbar danach wurde das Endothel gefärbt und unter dem Lichtmikroskop auf mögliche Schäden hin untersucht.

Da die Hornhäute nur einer mechanischen Belastung ausgesetzt worden waren, konnten latente toxische Schäden ausgeschlossen werden. Mechanisch hervorgerufene Zellschäden hätten sich durch ein Eindringen des Trypanblau-Farbstoffes gezeigt.

Das Endothel zeigte nach der ausgeführten mechanischen Belastung keine nennenswerten Zeichen einer Schädigung. Bei allen Hornhäuten war es nur zur Anfärbung weniger Zellen, verteilt auf ein bis zwei Stellen, gekommen (Tab. 3.3).

**Tabelle 3.3** Absolute Zahlen der beim Kontakt mit dem Kapton®/Teflon® „Peel Pouch“ geschädigten Endothelzellen

Hornhaut	1	2	3	4	5
Zahl der mit Trypanblau angefärbten Zellen/Hornhaut	25	57	83	151	41

Der Anteil geschädigter Endothelzellen betrug pro Lamelle nur <0,1 %. Dieses Ergebnis macht deutlich, daß die Endothelzellen eine Berührung mit der Oberfläche der „Peel Pouches“ sehr gut tolerieren. Die Verbesserung der Gleitfähigkeit durch Befeuchtung der „Peel-Pouch“-Oberfläche mit einem Tropfen Balanced Salt Solution hatte ausgereicht, um dieses Ergebnis zu erzielen.

### 3.3 Vitrifikation von Hornhautlamellen bei -140°C

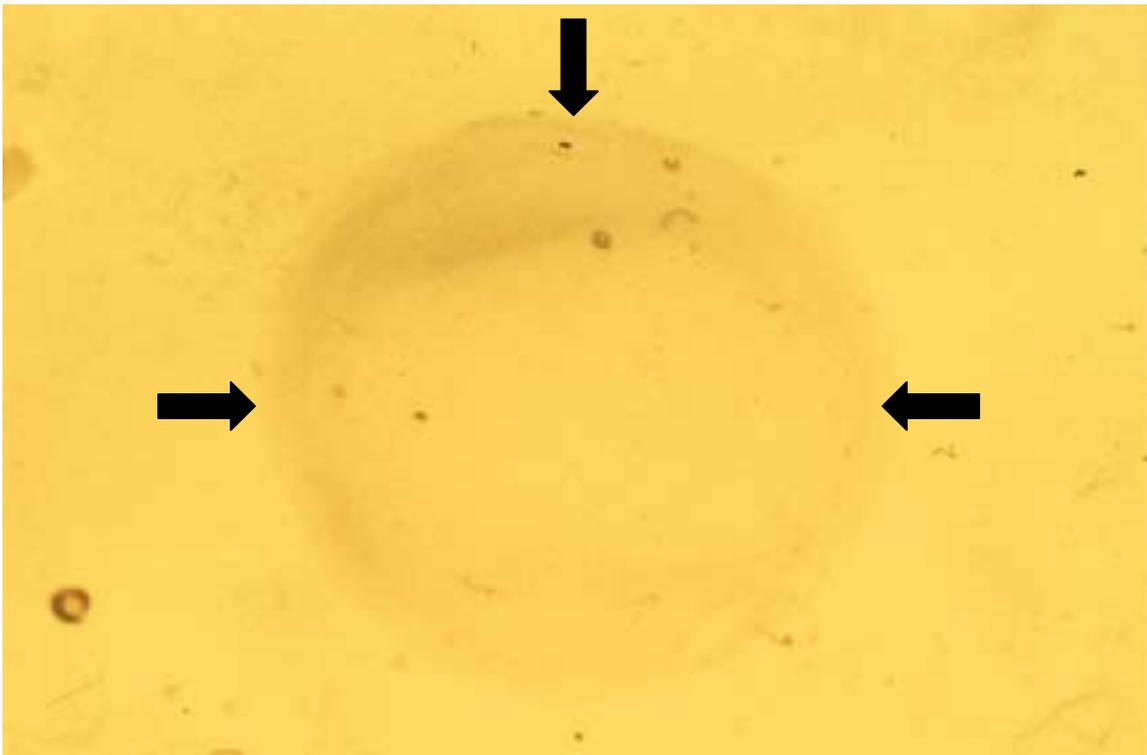
Ein weiterer Versuch diente der Feststellung, ob die neu entwickelte Gefriervorrichtung eine Vitrifikation der Hornhautlamellen ermöglicht. Die Abkühlung der Lamellen, die zuvor gegenüber VS41a nach dem von Bourne entwickelten Protokoll (Tab. 2.2) exponiert worden waren, erfolgte dabei zunächst nur bis -140°C. Die Abkühlung wurde durch das Eintauchen der „Peel Pouches“ in das auf -140°C abgekühlte Propan erreicht. Dieser Temperatur blieben die Lamellen für 30 Minuten ausgesetzt. Danach wurden sie,

im „Peel Pouch“ verbleibend, einzeln aus dem Propan-Bad herausgenommen und unmittelbar im Anschluß daran fotografiert. Für die Aufnahmen wurde der „Peel Pouch“ von hinten mit einer Lichtquelle durchleuchtet. Die Transparenz des „Peel Pouch“ ermöglichte es, Eis- oder Rißbildungen im Gefriergut oder deren Ausbleiben zu erkennen. Durch eine sehr kurze Zeitspanne (etwa 1 Sekunde) zwischen der Entnahme der „Peel Pouches“ und der Fotoaufnahme konnten sichtbare Veränderungen des Gefriergutes durch eine Erwärmung verhindert werden.

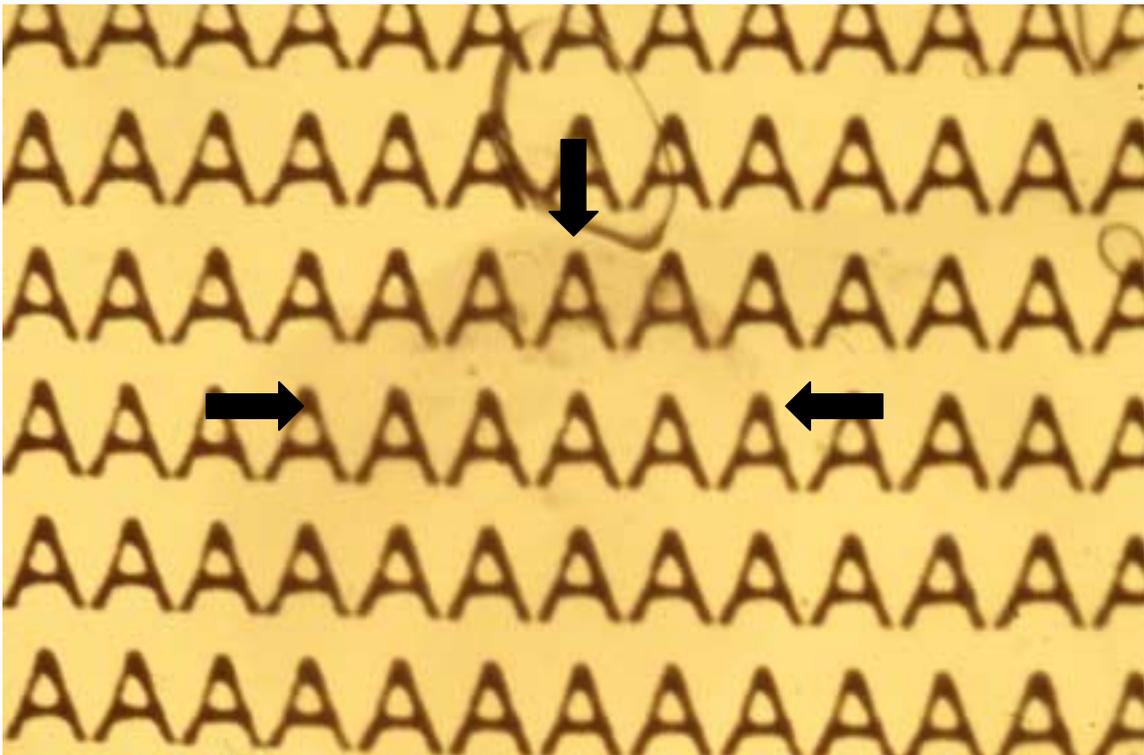
Wie die Abbildung 13 zeigt, kam es weder in der Lamelle, noch in der umgebenden Vitrifikationslösung zu einer makroskopisch erkennbaren Eis- oder Rißbildung. Die Lamelle blieb klar.

Um das Ergebnis besser veranschaulichen zu können, wurde bei der in Abbildung 14 dargestellten Lamelle eine auf transparente Folie gedruckte Schriftprobe mit in den „Peel Pouch“ eingelegt. Die Schrift blieb lesbar.

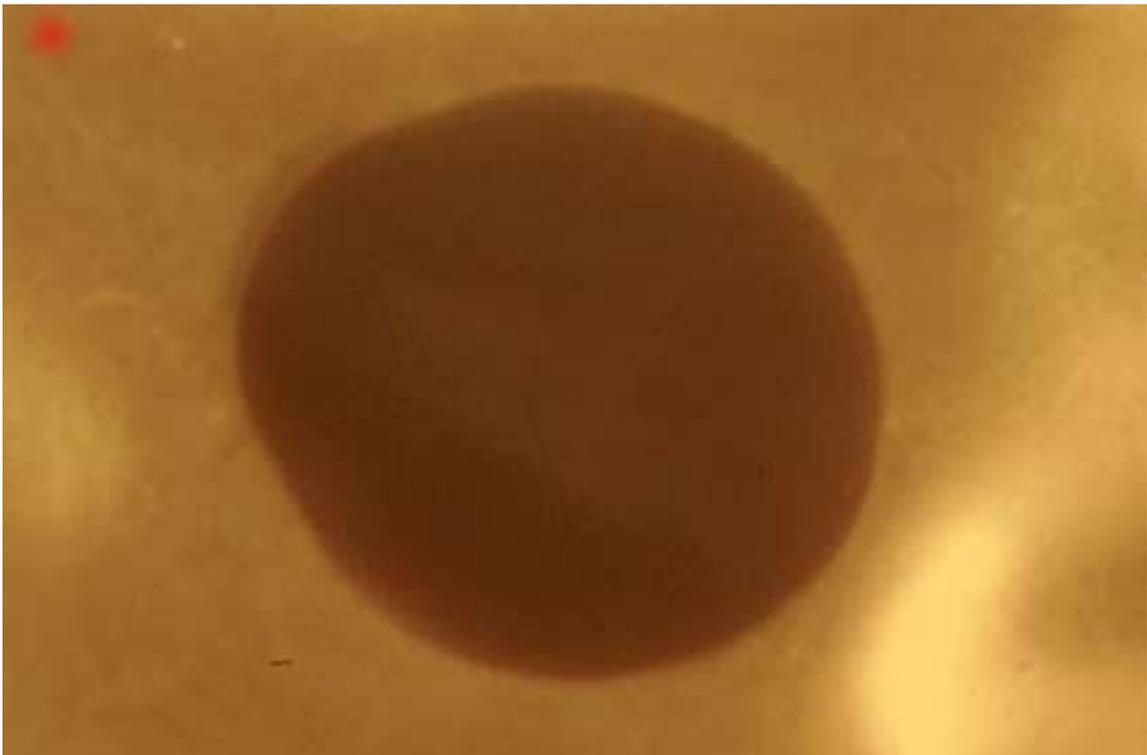
Wurden die Lamellen statt mit der Vitrifikationslösung VS41a für die gleiche Zeit mit reinem CPTES inkubiert und anschließend in flüssigem Propan auf  $-140^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, trat eine in den Abbildungen 15 und 16 gezeigte Eisbildung auf.



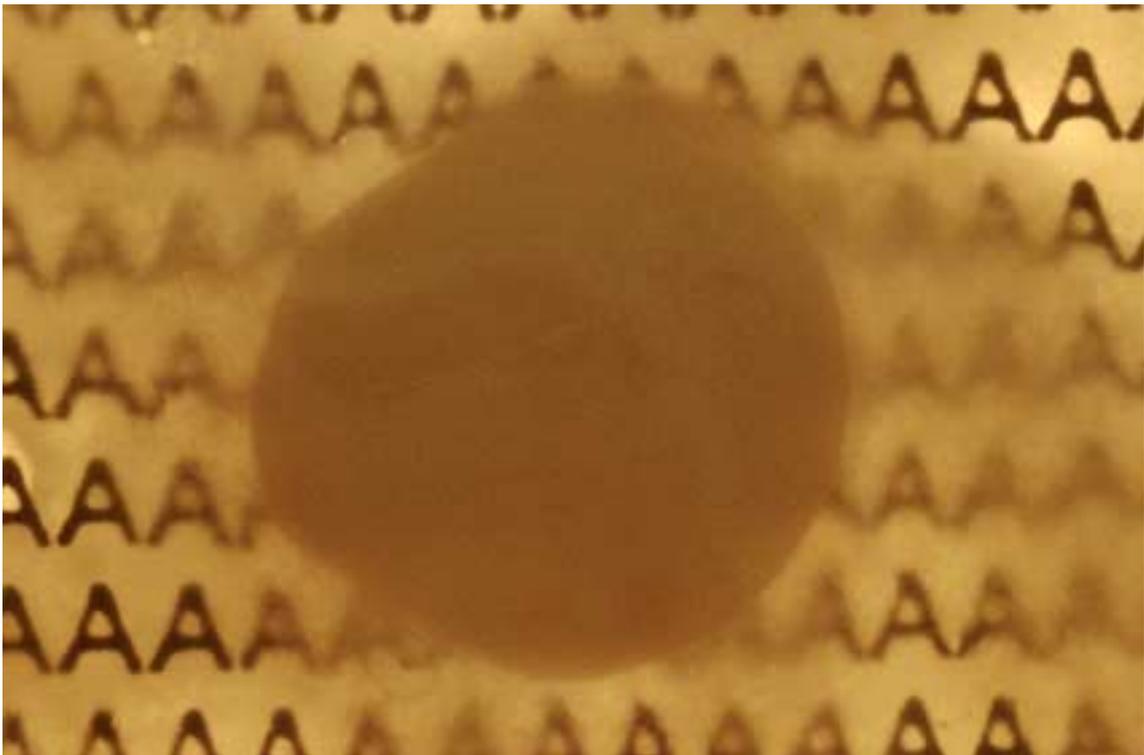
**Abbildung 13** Hornhautlamelle im Glaszustand umgeben von VS41a bei  $-140^{\circ}\text{C}$ ; bei der im Durchlicht fotografierten Lamelle sind weder Eis- noch Rißbildungen zu erkennen; die Pfeile markieren den Rand der Lamelle.



**Abbildung 14** Hornhautlamelle im Glaszustand umgeben von VS41a bei  $-140^{\circ}\text{C}$ ; zu der im Durchlicht fotografierten Lamelle wurde eine auf Folie gedruckte Schriftprobe mit in den Peel Pouch gelegt, um die erhaltene Transparenz der Lamelle zu verdeutlichen; die Pfeile markieren den Rand der Lamelle.

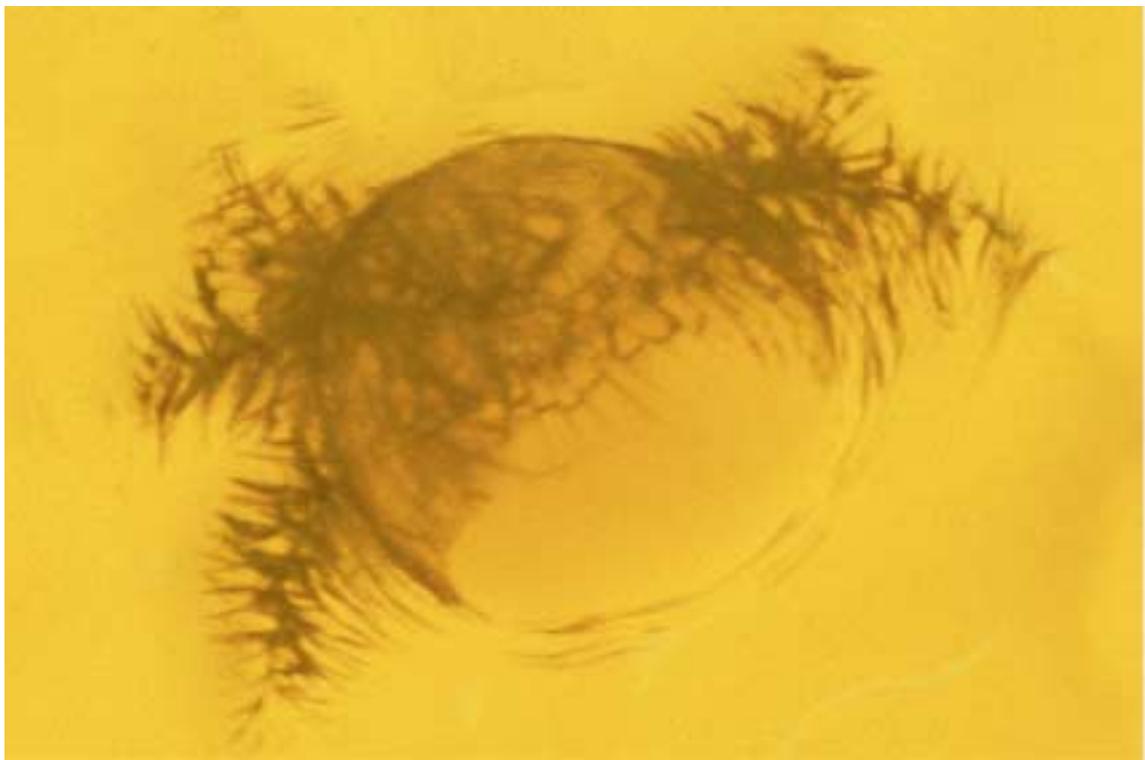


**Abbildung 15** Hornhautlamelle im gefrorenen Zustand umgeben von reinem CPTES bei  $-140^{\circ}\text{C}$ . Die Lamelle wurde unter den gleichen Bedingungen abgekühlt und fotografiert wie die Lamelle aus Abb. 13.



**Abbildung 16** Hornhautlamelle im gefrorenen Zustand umgeben von reinem CPTES bei  $-140^{\circ}\text{C}$ ; das Einlegen einer Schriftprobe in den Peel Pouch verdeutlicht die Eisbildung und die dadurch aufgehobene Transparenz der Lamelle.

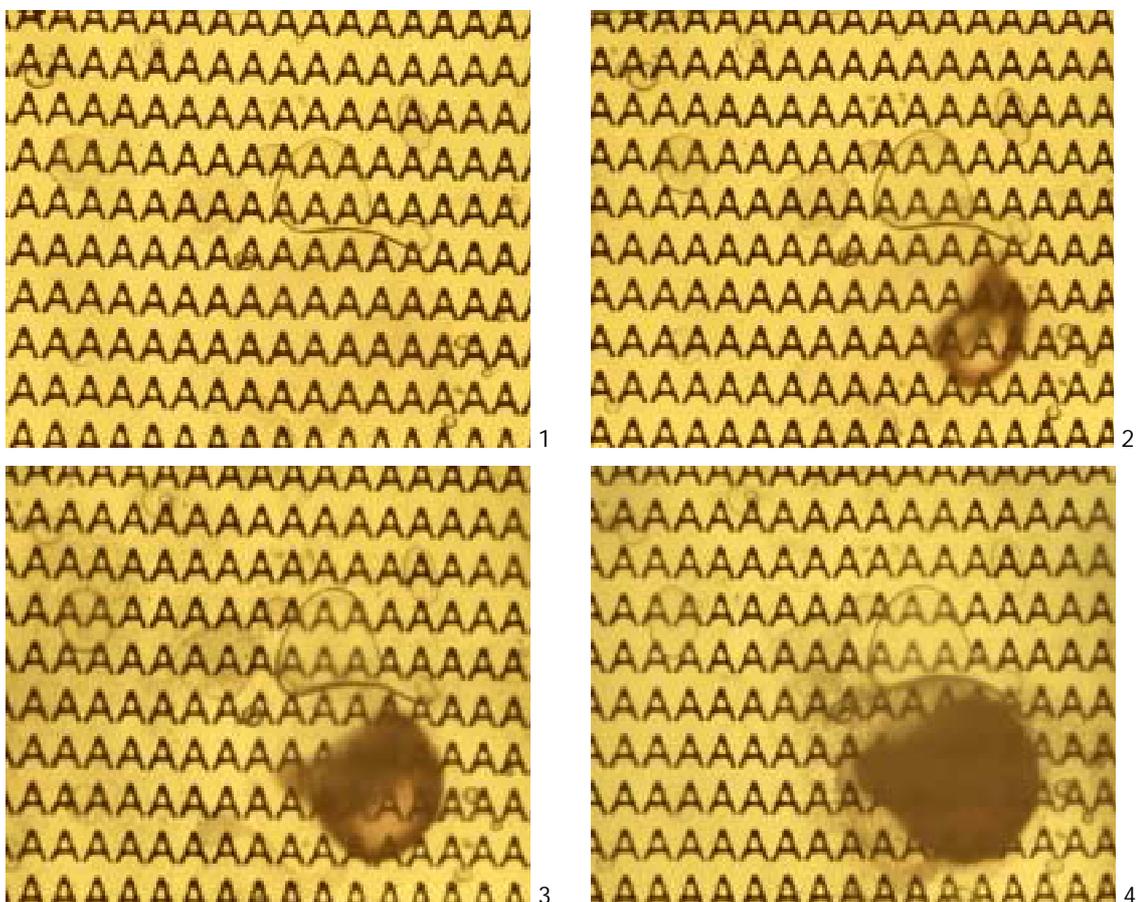
Die Abbildung 17 verdeutlicht, daß mit der entwickelten Einfriervorrichtung nicht nur die Vitrifikation erreicht, sondern auch die Reißbildung im Gefriergut verhindert werden konnte. Sie zeigt eine Lamelle, die zwar entsprechend den Lamellen aus Abbildung 13 und 14 in VS41a inkubiert und abgekühlt wurde, jedoch erfolgte die Abkühlung durch direktes Eintauchen des Gefriergutes in flüssigen Stickstoff. Auf diese Weise wurde zwar ebenfalls eine Vitrifikation erreicht, jedoch trat eine im Durchlicht deutlich erkennbare Reißbildung auf.



**Abbildung 17** Hornhautlamelle im gefrorenen Zustand umgeben von VS41a nach Abkühlung durch direktes Eintauchen des Gefriergutes in flüssigen Stickstoff; das Foto zeigt zwar eine erhaltene Transparenz der Lamelle, jedoch sind sowohl im Bereich der Lamelle, als auch in der Vitrifikationslösung selbst Risse erkennbar.

### 3.4 Fotografische Dokumentation der Devitrifikation bei Raumtemperatur

Beim langsamen Auftauen zuvor erfolgreich vitrifizierter Lamellen bei Raumtemperatur konnte eine Devitrifikation beobachtet werden. Um diesen Vorgang veranschaulichen zu können, wurde die in Abbildung 18 dargestellte Bildfolge erstellt. Die Bilder stammen von der bereits in Abbildung 13 dargestellten Lamelle.



**Abbildung 18** Darstellung der Devitrifikation bei Raumtemperatur einer zuvor vitrifizierten Hornhautlamelle.

Die Devitrifikation zeigt sich auf den Bildern anhand einer allmählichen Ausbreitung von Eis im Gefriergut. Die abgebildeten Fotos wurden innerhalb von 30 Sekunden nach dem Herausnehmen der Lamelle aus dem Propan-Bad gemacht.

### 3.5 Endothelzellanalyse nach erfolgter Vitrifikation bei -196°C und Erwärmung im Wasserbad

Da sich sowohl der Gefriergutbehälter als auch die neu entwickelte Einfriervorrichtung für die Durchführung eines Vitrifikationsversuches als geeignet erwiesen hatten, sollte nun versucht werden, ob die Hornhautlamellen eine weitere Abkühlung bis -196°C und die anschließende Erwärmung im Wasserbad tolerieren. Sechs Hornhautlamellen wurden zu diesem Zweck allen Schritten des in Kapitel 2.1 dargestellten Versuchsablaufes unterzogen.

Bei allen sechs Hornhautlamellen gelang wiederum die Vitrifikation bei Abkühlung bis -140°C. Da es während der weiteren Abkühlung bis -196°C zu einem festen Niederschlag aus kleinen Eiskristallen auf der Außenfläche der Kapton<sup>®</sup>/Teflon<sup>®</sup> „Peel Pouches“ kam, wurde die Beurteilung einer möglichen Rißbildung erschwert. In den niederschlagsfreien Bereichen konnte jedoch keine Rißbildung beobachtet werden. Die Hornhautlamellen, die anschließend für 48 Stunden in flüssigem Stickstoff gelagert worden waren, wurden gemäß der Angaben in Tabelle 2.6 aufgetaut.

Beim Schritt der schnellen Erwärmung im 40°C warmen Wasserbad konnte bei drei Lamellen keine Devitrifikation beobachtet werden. Bei den drei übrigen Lamellen kam es hingegen zur Devitrifikation. Die dabei auftretende Eisbildung und die komplette Auflösung des Eises erfolgten in weniger als zwei Sekunden. Zusammen mit dem von VS41a bekannten Schmelzpunkt (-38°C)<sup>71</sup> läßt sich aufgrund dieser Angabe eine Aufwärmrate von 3060°C/min berechnen.

Die nach Ausschleusung der Vitrifikationslösung und der 24-stündigen Organkultur durchgeführte Färbung zeigte ein unbefriedigendes Ergebnis. Nur bei zwei der sechs Lamellen konnten lebende Endothelzellen nachgewiesen werden (Tab. 3.4). Bei einer dieser beiden Lamellen war es zuvor zur Devitrifikation gekommen, bei der anderen nicht. Auf eine computerunterstützte Analyse des Endothels wurde wegen des bereits makroskopisch enttäuschenden Ergebnisses verzichtet. Die Abbildungen 19 und 20 zeigen Ausschnitte aus den vitalen Bereichen der Lamellen Nr. 4 und Nr. 5.

**Tabelle 3.4** Endothelbefund von Hornhautlamellen nach Durchführung des gesamten in Kapitel 2.1 zusammengefaßt dargestellten Vitrifikationsverfahrens; Anteil des zerstörten Endothels an der gesamten Endothelzellfläche ermittelt aufgrund der abgebildeten makroskopischen Aufnahme

Lamelle	1	2	3	4	5	6
Zerstörtes Endothel [% Gesamtfläche]	100	100	100	90	90	100



**Abbildung 19** Mikroskopisches Bild des Hornhautendothels der zunächst vitifizierten, dann bei  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagerten, anschließend im Wasserbad wiedererwärmten und für 24 Stunden organkultivierten Hornhautlamelle Nr.5; die zu erkennende Riesenzellbildung entsteht durch Fusion von Endothelzellen und ist ein Zeichen der erfolgten Schädigung (Vergrößerung 400x).



**Abbildung 20** Mikroskopisches Bild des Hornhautendothels der zunächst vitifizierten, dann bei  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagerten, anschließend im Wasserbad wiedererwärmten und für 24 Stunden organkultivierten Hornhautlamelle Nr.4; in dem nicht zerstörten Bereich der Endothelfläche zeigten die Endothelzellen ihre charakteristische hexagonale Form; bei einigen Zellen ist jedoch eine schwache Anfärbung der Zellkerne zu erkennen, die Zeichen einer Zellmembranschädigung ist (Vergrößerung 400x).

Um die Ursachen für die Endothelzellschädigung näher bestimmen zu können, wurde nun untersucht, ob die Organkultur bzw. die verwendete Vitrifikationslösung einen schädigenden Einfluß auf das Endothel haben.

### 3.6 Toleranz des Hornhautendothels gegenüber dem verwendeten Organkulturmedium

Die Organkultur dient, wie bereits beschrieben, dem Nachweis latenter Schäden des Endothels durch das Vitrifikationsverfahren. Zunächst wurde untersucht, ob die Organkultur selbst einen schädigenden Effekt auf das Endothel hat. Die

Hornhautlamellen wurde deshalb direkt nach der Präparation in Organkulturmedium für 24 Stunden inkubiert.

Die Untersuchung zeigte, daß die organkultivierten Lamellen, wie die unbehandelten Lamellen, ein vollständig intaktes Endothel ohne Zeichen freiliegender Descemet-Membran besaßen. Auch hier zeigten die Zellen ihre charakteristische hexagonale Form. Die mittlere Zelldichte betrug jedoch 4248 Zellen/mm<sup>2</sup> und lag damit um 4,6% höher, als die Zelldichte der unbehandelten Lamellen.

Einen weitergehenden Vergleich ermöglichen die in den Tabellen 3.5 und 3.6 dargestellten Ergebnisse.

**Tabelle 3.5** Ergebnisse der Endothelzellanalyse von Hornhautlamellen nach 24 stündiger Organkultur basierend auf mikroskopischen Aufnahmen des Endothels

Lamelle Nr.:		1	2	3	4	5	6	Σ (gesamt)
Zahl der analysierten Zellen		480	778	832	825	819	850	4584
Analysierte Fläche [mm <sup>2</sup> ]		0,117	0,187	0,180	0,195	0,198	0,196	1,073
								<b>Mittelwert</b>
Zelldichte [Zellen/mm <sup>2</sup> ]		3997	4156	4621	4232	4145	4339	4248
Standardabweichung der Zelldichte		224,0	120,1	102,0	115,1	236,6	163,7	160,3
Mittelwert der Zellgröße [µm <sup>2</sup> ]		250	240	216	236	241	230	236
Standardabweichung der mittleren Zellgröße		21,7	7,0	4,6	6,2	13,8	8,6	10,3
Prozentuale Verteilung der Zellgröße [%]	>500 µm <sup>2</sup>	0,2	0	0	0	0	0	0
	500-400 µm <sup>2</sup>	1,6	0	0	0	0,2	0	0,3
	400-300 µm <sup>2</sup>	12,8	7,2	1,4	7,6	7,5	5,7	7,0
	300-200 µm <sup>2</sup>	52,3	54,3	41,6	50,5	55,2	49,0	50,5
	<200 µm <sup>2</sup>	33,1	38,5	57,0	41,9	37,1	45,3	42,2

**Tabelle 3.6** Endothelbefund von Hornhautlamellen nach 24 stündiger Organkultur; Anteil des zerstörten Endothels an der gesamten Endothelzellfläche ermittelt anhand makroskopischer Aufnahmen

Lamelle	1	2	3	4	5	6
Zerstörtes Endothel [% Gesamtfläche]	0	0	0	0	0	0

### 3.7 Toleranz des Hornhautendothels gegenüber der verwendeten Vitrifikationslösung

Anhand von drei Versuchen mit jeweils sechs Hornhautlamellen wurden die toxischen Eigenschaften der Vitrifikationslösung untersucht.

1. Die Hornhautlamellen der ersten Versuchsgruppe wurden zu diesem Zweck direkt nach der Präparation entsprechend den Verfahren aus Tabelle 2.2 und 2.7 gegenüber VS41a exponiert. Darauf folgte eine 24-stündige Organkultur. Bemerkenswert war dabei die hohe Variabilität der Ergebnisse trotz der identischen Versuchsbedingungen (Tab. 3.7 und Abb. 21).

**Tabelle 3.7** Endothelbefund von Hornhautlamellen nach Ein- und Ausschleusung der Vitrifikationslösung VS41a nach den in Tabelle 2.2 und 2.7 beschriebenen Methoden in Anlehnung an Bourne<sup>46</sup>; Anteil des zerstörten Endothels an der gesamten Endothelzellfläche ermittelt anhand makroskopischer Aufnahmen

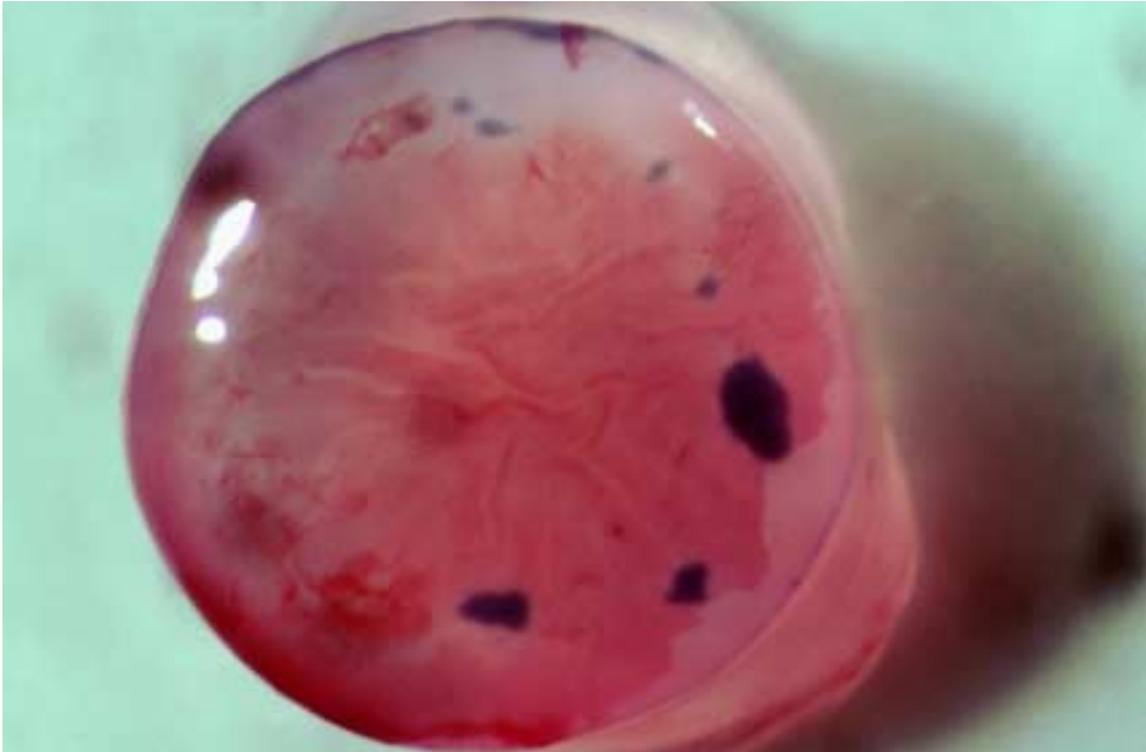
Lamelle	1	2	3	4	5	6
Zerstörtes Endothel [% Gesamtfläche]	48	70	15	4	6	2

Aufgrund der z.T. großflächigen Endothelzerstörung konnten die mikroskopischen Fotografien nicht wie zuvor vom Zentrum und dem 1. bis 4. Quadranten der Lamellen gemacht werden. Statt dessen wurden nur von den mit vitalen Zellen belegten Bereichen Aufnahmen gemacht.

Die Analyse dieser Bereiche ergab eine durchschnittliche Zelldichte von 3683 Zellen/mm<sup>2</sup> (Tab. 3.8).

**Tabelle 3.8** Ergebnisse der Endothelzellanalyse von Hornhautlamellen nach Ein- und Ausschleusung der Vitrifikationslösung VS41a nach den in Tabelle 2.2 und 2.7 beschriebenen Methoden in Anlehnung an Bourne<sup>46</sup>; basierend auf mikroskopischen Aufnahmen des Endothels

Lamelle Nr.:	1	2	3	4	5	6	Σ (gesamt)	
Zahl der analysierten Zellen	382	421	660	642	639	595	3339	
Analysierte Fläche [mm <sup>2</sup> ]	0,096	0,127	0,140	0,179	0,173	0,159	0,874	
							<b>Mittelwert</b>	
Zelldichte [Zellen/mm <sup>2</sup> ]	4010	3167	3919	3576	3672	3754	3683	
Standardabweichung der Zelldichte	391,4	674,7	313,2	88,6	193,3	129,1	298,4	
Mittelwert der Zellgröße [µm <sup>2</sup> ]	252	286	256	279	272	266	269	
Standardabweichung der mittleren Zellgröße	20,1	15,6	22,3	6,9	15,3	9,1	14,9	
Prozentuale Verteilung der Zellgröße [%]	>500 µm <sup>2</sup>	1,8	4,9	2,1	1,9	0,0	0,0	1,8
	500-400 µm <sup>2</sup>	2,4	9,7	2,3	6,2	4,1	2,3	4,5
	400-300 µm <sup>2</sup>	8,4	17,7	10,3	19,0	16,2	17,6	14,9
	300-200 µm <sup>2</sup>	42,2	29,9	45,2	39,2	54,3	52,2	43,8
	<200 µm <sup>2</sup>	45,2	37,8	40,1	33,7	25,4	27,9	35,0



**Abbildung 21** Makroskopischer Endothelbefund nach Ein- und Ausschleusung der Vitrifikationslösung VS41a nach den in Tabelle 2.2 und 2.7 beschriebenen Methoden in Anlehnung an Bourne<sup>46</sup>; etwa 5% des Endothels zeigt eine Anfärbung mit Trypanblau und damit Zeichen einer Schädigung; daneben sind im Zentrum der Lamelle 4 Falten der Descemet-Membran zu erkennen, die durch mechanische Beanspruchung hervorgerufen werden; die inhomogene Anfärbung mit Alizarinrot S beruht auf der Ablagerung von Farbstoffsedimenten und hat keine Bedeutung für die Qualität des Endothels.

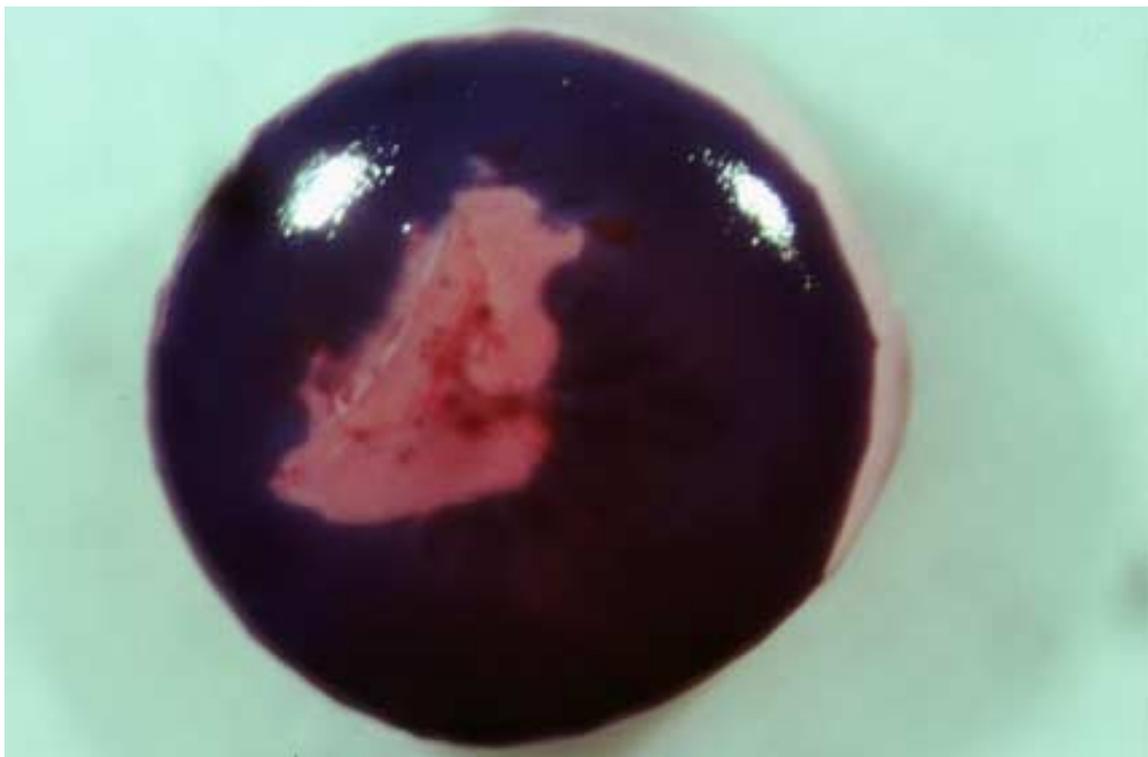
Die z.T. großflächige Endothelzerstörung und die hohe Variabilität der Ergebnisse, war Anlaß für die Durchführung von zwei weiteren Versuchen, bei denen die Temperatur der Lösungen, die Anzahl der Konzentrationsstufen und die Verweildauer der Hornhautlamellen in den Lösungen variiert wurden. Durch diese Behandlungen kam es zu einer stärkeren Schädigung des Endothels.

2. Das nach eigenen Überlegungen durchgeführte Verfahren (siehe Protokoll Tab. 2.3 und 2.7) führte zu einem Verlust von 9-71% des Endothels. (Tab. 3.9).

**Tabelle 3.9** Ergebnisse der Endothelzellanalyse von Schweinehornhautlamellen nach Ein- und Ausschleusung der Vitrifikationslösung VS41a nach der in den Tabellen 2.3 und 2.7 beschriebenen Methoden

Lamelle	1	2	3	4	5	6
Zerstörtes Endothel [% Gesamtfläche]	20	9	35	40	40	71

3. Die von Wusteman vorgeschlagene Erhöhung der Temperatur auf 21,5°C bei gleichzeitiger Verkürzung der Expositionszeiten (Tab. 2.4 und 2.8) ergaben einen Verlust von 83-100% des Endothels (Abb. 22 und Tab. 3.10).



**Abbildung 22** Makroskopischer Endothelbefund nach Ein- und Ausschleusung der Vitrifikationslösung VS41a nach den in Tabelle 2.4 und 2.8 beschriebenen Methoden in Anlehnung an Wusteman <sup>47</sup>; dargestellt ist die Lamelle 4 aus der Tabelle 3.10, bei der etwa 85% des Endothel zerstört wurden.

**Tabelle 3.10** Ergebnisse der Endothelzellanalyse von Schweinehornhautlamellen nach Ein- und Ausschleusung der Vitrifikationslösung VS41a nach den in Tabelle 2.4 und 2.8 beschriebenen Methoden in Anlehnung an Wusteman <sup>47</sup>

Lamelle	1	2	3	4	5	6
Zerstörtes Endothel [% Gesamtfläche]	100	90	98	85	83	96

Aufgrund des eindeutigen makroskopischen Befundes wurde in den beiden letzten Versuchen auf eine detaillierte Endothelzellanalyse anhand von mikroskopischen Bildern verzichtet.